Aus dem Hygiene-Institut der Philipps-Universität
Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. R. Siegert

DIE BILDUNG VON PASTEURELLA-FLACHRANDKOLONIEN IN GEGENWART VON SERUM UND EXOENZYMEN PROTEOLYTISCHER ACINETOBACTERES

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

CLAUS JAHN
aus Neuhof

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Philipps-Universität
Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. R. Siegert

DIE BILDUNG VON PASTEURELLA-FLACHRANDKOLONIEN IN GEGENWART VON SERUM UND EXOENZYMEN PROTEOLYTISCHER ACINETOBACTERES

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

CLAUS JAHN
aus Neuhof

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg/Lahn am: 26. Januar 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. F.Neurath
Referent:	Prof. Dr. W.Mannheim
Correferent:	Prof. Dr. W.Schiff

Inhalt

		Seite
1.0.0.	Einleitung	1
1.1.0.	Betrachtung des gegenwärtigen Kenntnisstandes über Wuchsformvariationen	1
1.2.0.	Erläuterungen zu den verwendeten Bakterien	3
1.3.0.	Motivation zur vorliegenden Arbeit	4
2.0.0.	Material und Methoden	5
2.1.0.	Verwendete Bakterienstämme	5
2.1.1.	Produzenten des bakteriellen Faktors (AF)	5
2.1.2.	Flachrandkolonien-bildende Bakterienstämme	5
2.2.0.	Anzüchtung und Haltung der Bakterienstämme	5
2.2.1.	Pasteurella und Actinobacillus	5
2.2.2.	Acinetobacter	5
2.2.3.	Identifizierung des untersuchten Bacillus-Stammes	6
2.3.0.	Kulturmedien	6
2.3.1.	Medien für die Anzüchtung und Haltung der Keime	6
2.3.2.	Medien zum Nachweis des Serumfaktors (SF)	6
2.3.3.	Medium zum Nachweis des bakteriellen Exofaktors (AF)	7
2.3.4.	Medien für die Produktion des AF	7
2.4.0.	Nachweissysteme	8
2.4.1.	Nachweissystem für den AF	8
2.4.2.	Nachweissystem für den SF	9
2.5.0.	Säulentrennung	9
2.5.1.	Trennung mit DEAE-Sephadex A 50	9
2.5.2.	Trennung mit Sephadex G 100	10
2.6.0.	Seren	11
2.7.0.	Chemische Verfahren	12
2.7.1.	Proteinfällung und Proteinbestimmung	12

2.7.2. Nachweis von Hydrolasen 12

2.8.0. Chemikalien 12

2.8.1. Markerproteine 12

2.8.2. Sonstige Chemikalien 12

2.9.0. Geräte 13

2.9.1. Dialyseschlauch 13

2.9.2. Filter 13

2.9.3. Fraktionssammler 13

2.9.4. Photometer 13

2.9.5. Temperaturgradienteninkubator 13

3.0.0. Ergebnisse 14

3.1.0. Verbreitung des Flachrandformenphänomens 14

3.1.1. Flachrandkolonien-bildende Bakterien 14

3.1.2. Flachrandkolonien-induzierende Bakterien 14

3.2.0. Optimierung des Testsystems 14

3.2.1. Bestimmung der optimalen Einsaatdichte von Pasteurella 14

3.2.2. Temperaturabhängigkeit des Wachstums von P. pneumotropica A/5a und A. haemolyticus 66124/64 15

3.2.3. Effekt einer Zeitvorgabe für A. haemolyticus 66124/64 vor P. pneumotropica A/5a 16

3.3.0. Rolle und Natur des Serumfaktors SF 16

3.3.1. Notwendigkeit von Blut oder Serum zur Erzeugung von Flachrandkolonien 16

3.3.2. Verbreitung des SF im Serum verschiedener Tiere 17

3.3.3. Weitere Charakterisierung des SF 17

3.4.0. Charakterisierung des von A. haemolyticus 66124/64 produzierten Faktors (AF) 18

3.4.1. Produktionsbedingungen 18

3.4.2. Effekt von Sauerstoff auf die Ausbeute an AF 18

3.4.3. Wärmestabilität des AF im Kulturüberstand 19

3.4.4. pH-Stabilität des AF im Kulturüberstand 19

3.4.5. Stabilität des AF im Kulturüberstand bei 4^{o} C 20

3.4.6. Proteinfällung im Kulturüberstand mit Ammoniumsulfat 20

3.4.7. Trennung auf DEAE-Sephadex G 50 20

3.4.8. Wärmestabilität des AF im DEAE-Eluat 21

3.4.9. Effekt von Pronase auf den AF im DEAE-Eluat 21

3.4.10. Hydrolasen-Aktivität des AF-haltigen DEAE-Eluats 22

3.4.11. Schätzung des Molekulargewichtes des AF 22

4.0.0. Diskussion 24

4.1.0. Reversible Wuchsformvariation bei zwei Pasteurella-Stämmen 24

4.2.0. Der Exofaktor (AF) von A. haemolyticus 66124/64 26

5.0.0. Zusammenfassung 28

6.0.0. Tabellen und Abbildungen 29

7.0.0. Literatur 50

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0030

1.0.0. Einleitung

1.1.0. Betrachtung des gegenwärtigen Kenntnisstandes über Wuchsformvariationen

Wuchsformvariationen sind heute bei zahlreichen Bakterien bekannt, und man kann sie in zwei verschiedene Kategorien einordnen:

genetisch bedingte Wuchsformvariationen und

phänotypische Wuchformvariationen.

Sehr ausführlich wurden die Wuchsformvariationen bei gram-negativen Darmbakterien untersucht. Ihre Wuchsformen werden als S- (smooth), R- (rough) und M- (mucoid) bezeichnet (ARKWRIGHT, 1920, 1921; WHITE, 1929).
Die morphologischen Kriterien der S-/ R-/ M-Formen sind im folgenden gegenübergestellt:

	Begrenzung	Form	Oberfläche
S- :	rund	gewölbt	glatt, glänzend
R- :	unregelmäßig	flach	rauh, matt
M- :	rund	hochgewölbt, konfluierend	glatt, glänzend, feucht

Es zeigte sich, daß oft Parallelen zwischen der Morphologie S-/ R- und der Antigenität O-/ o- bestehen. Mikroskopische Untersuchungen von S-/ R-Formen bei gram-negativen Darmbakterien brachten außer dem Hinweis, daß es sich um molekulare Phänomene handeln müßte, keine Erklärung für das Auftreten der verschiedenen Wuchsformen (v. PRITTWITZ und GAFFRON, 1952).
Dies bestätigte sich, als bei Salmonellen, Shigellen und Escherichia coli der Verlust einiger Zuckerbausteine in den Lipopolysacchariden der Bakterienzellwand als ursächlich für den Wechsel von der SO- zur Ro-Form erkannt wurde. Die Ro-Formen entstehen in diesen Fällen durch

Verlustmutationen aus den SO-Formen (WESTPHAL und LÜDERITZ, 1960; KAUFFMANN, 1961).
Durch UV-Bestrahlung gelang es bei Clostridium welchii und Clostridium sporogenes, Kolonien mit federartigen Ausläufern zu induzieren (RAFI SHAIKH und LOMINSKY, 1975). Auch hierbei waren durch Genveränderung Verlustmutanten entstanden, die einen Enzymdefekt besaßen. Dadurch konnte die Tochterzelle nicht mehr von der Mutterzelle abgetrennt werden. Das gleiche Phänomen konnte von den Autoren dadurch erzeugt werden, daß sie das Enzymsystem durch Suramin hemmten.
Zur Vorgeschichte der Entdeckung des biochemischen Mechanismus genetisch bedingter Wuchformvariationen gehört noch die Tatsache, daß hierbei die Rolle der DNS als Sitz der genetischen Information einer Zelle erkannt wurde.
DAWSON et al. (1932/33) war es gelungen, bei Pneumokokken die Umwandlung von Typ II- in Typ III-Keime durch Einimpfen lebender Typ II/R-Keime auf ein Medium, das abgetötete Typ III/S-Keime enthielt, zu bewirken. Als hierbei wirksames Prinzip wurde die Desoxyribonucleinsäure erkannt (AVERY et al., 1944).
Diese Entdeckungen erlauben auch die Einordnung einer früheren Beobachtung in die Gruppe der genetisch bedingten Wuchsformvariationen. DOMBROVICEANU und SORU (1934) hatten bei Vibrio cholerae den Wechsel von der S- zur R-Form durch Phagen induziert.
Den hier beschriebenen genetisch bedingten Wuchsformvariationen stehen die phänotypischen Wuchsformvariationen gegenüber.
So berichtete KRÖGER (1955) von reversiblen S-/ R-Wuchsformvariationen ohne Wechsel in der Antigenstruktur bei Salmonella paratyphi B, Stamm Kröger BI und BII, die er bei Anzüchtung auf verschiedenen Kulturmedien beobachtete. Hier ist die Wuchsform Ausdruck der Anpassung des Keims an seine Umgebung.
Phänotypische Wuchsformvariationen sind jedoch noch nicht so gut untersucht, wie die genetisch bedingten.

Bei Pasteurellen sind bisher folgende Beobachtungen über Wuchsformvariationen gemacht worden.
Bei Pasteurella multocida kennt man genetisch bedingte M-/ S-/ S^r-/ R-Wuchsformen, die auch verschiedene Antigenstrukturen besitzen (ELBERG und CHENG-LEEHO, 1950; CARTER und BIGLAND, 1953; CARTER, 1955, 1957).
Antigenetisch verschiedene S- und R-Formen sind ebenfalls bei Pasteurella haemolytica beschrieben (BIBERSTEIN et a., 1958; WESSMAN, 1964).
HENRIKSEN und FRØHOLM (1975) berichteten über "spreading and corroding colonies", auf die in der Diskussion zur vorliegenden Arbeit noch näher einzugehen sein wird.
Ähnliche Beobachtungen machten TACU und TACU (1967) an "ringförmigen Pasteurellakulturen".
Eine ausführliche Beschreibung von morphologisch ähnlichen Kolonien findet sich in der zusammenfassenden Arbeit von HENRICHSEN (1972). Hier werden die unterschiedlichen Mechanismen beschrieben, die eine Ausbreitung von Bakterien auf Agaroberflächen ermöglichen.

1.2.0 Erläuterungen zu den verwendeten Bakterien

Für die Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden Keime der Gattung Pasteurella, Acinetobacter und Bacillus verwendet.
Die Gattung Pasteurella setzt sich aus vier Species zusammen:

P. multocida
P. pneumotropica
P. haemolytica
P. ureae

Die Gattung ist sehr nahe verwandt mit der Gattung Actinobacillus.
Pasteurellen sind kleine, gram-negative, bipolar anfärbbare, unbewegliche Stäbchen. Sie sind fakultativ anaerob (SMITH, 1974).
Nach LAUTROP (1974) enthält die Gattung Acinetobacter nur eine Species, A. calcoaceticus.
Alle anderen Untereinheiten und taxonomischen Gruppen erhalten hierbei subspezifischen Rang, so auch die proteolytischen Stämme, die früher als A. haemolyticus

klassifiziert wurden (MANNHEIM und STENZEL, 1963).
Es handelt sich um kurze, gram-negative Diplostäbchen, die strikt aerob wachsen.
Die Gattung Bacillus setzt sich aus stäbchenförmigen Bakterien zusammen, die meist polytrich begeißelt sind und hitzeresistente Endosporen bilden. Die Gram-Reaktion variiert von gram-positiv über gram-variabel bis gram-negativ. Sie sind fakultativ anaerob.
Charakteristisch für die Gattung Bacillus ist die enorme physiologische Verschiedenheit der einzelnen Species (GIBSON und GORDON, 1974).

1.3.0. Motivation zur vorliegenden Arbeit

Ausgangspunkt der Untersuchung war die zufällige Beobachtung, daß ein Stamm von Pasteurella pneumotropica auf Blutagarnährböden in der Umgebung von Acinetobacter haemolyticus-Kolonien eine auffällige Änderung seiner Wuchsform erfährt (MANNHEIM, pers. Mitteilung).
Die normalen halbkugeligen, glatten Kolonien bilden flache Randzonen aus. Dabei nimmt der Koloniedurchmesser zu. Man kann die Kolonieform am besten mit der Form eines Spiegeleies vergleichen, wobei jedoch, anders als bei der Spiegeleikolonie der Mycoplasmen, das Zentrum erhaben ist und nicht am Nährboden haftet.
Die Subkultur von Zellen aus der flachen Randzone ergibt in Abwesenheit des induzierenden Acinetobacter wieder die normale glatte Wuchsform von P. pneumotropica (Abb. 1).
Diese Phänomen ist -abgesehen von der Notwendigkeit der vorherigen Einwirkung des Acinetobacter- dem von HENRIKSEN und FRØHOLM beschriebenen Phänomen der "spreading and corroding colonies" bei P. multocida sehr ähnlich.

2.0.0. Material und Methoden

2.1.0. Verwendete Bakterienstämme

2.1.1 Produzenten des bakteriellen Faktors (AF)

Als mögliche Produzenten des AF wurden die in Tab. 4 aufgeführten Bakterienstämme untersucht. Die Tabellen 1 und 2 enthalten eine nähere mikrobiologische Charakteristik des zur Untersuchung des AF verwendeten Acinetobacter haemolyticus-Stammes, 66124/64 Marburg (HIM 496-7), sowie des ebenfalls als AF-aktiv entdeckten Bacillus spec. (HIM 551-2).

2.1.2. Flachrandkolonien-bildende Bakterienstämme

Um die Verbreitung der Flachrandinduzierbarkeit durch den AF zu untersuchen, wurden die in Tab. 5 aufgeführten Bakterienstämme überprüft. Tab. 3 enthält eine genauere Charakteristik des bei der Untersuchung des AF verwendeten Pasteurella pneumotropica-Stammes A/5 a (HIM 496-5).

2.2.0. Anzüchtung und Haltung der Bakterienstämme

2.2.1. Pasteurella und Actinobacillus

Die untersuchten Pasteurella- und Actinobacillus-Stämme wurden aus lyophilisierten Sammlungen auf Blut- und Kochblutagarplatten angezüchtet.
P. pneumotropica A/5a wurde neben der koloniemorphologischen Beurteilung mikroskopisch und kulturell-biochemisch überprüft (Tab. 3). Der Stamm wurde alle 3-4 Tage auf einen Kochblutagar weitergeimpft und wie schon zur Anzüchtung aerob bei 37° C 24 Std. bebrütet.

2.2.2. Acinetobacter

Die Anzüchtung der Acinetobacter-Stämme erfolgte entsprechend der der Pasteurella-Stämme. A. haemolyticus

wurde ebenfalls durch Beurteilung der Mikromorphologie und seiner kulturell-biochemischen Leistungen identifiziert. Die Überimpfung erfolgte alle 2-4 Wochen auf eine Blutagarplatte mit anschließender aerober Bebrütung bei 37°C für 24 Std..

2.2.3. Identifizierung des untersuchten Bacillus-Stammes

Der untersuchte Bacillus-Stamm wurde als Kontaminant auf einer Nachweisplatte für die AF-Aktivität entdeckt. Zu seiner Charakterisierung wurden seine morphologischen und physiologischen Eigenschaften untersucht. Der Keim wurde unter der Nummer WIM 551-2 in die Lyophilkultursammlung des Hygiene-Instituts Marburg aufgenommen.

2.3.0. Kulturmedien

2.3.1. Medien für die Anzüchtung und Haltung der Keime

Für die Anzüchtung und Fortführung der Bakterien wurden Blut- und Kochblutagarplatten verwendet.
Zur Herstellung der Blutagarplatten wurde Columbia Agarbasis (Oxoid Ltd. London) nach Vorschrift gelöst und 20 min bei 121° C autoklaviert. Nach Abkühlen auf 45° C wurde der Agar mit 5 % (v/v) sterilem Hammelblut versetzt.
Bei der Herstellung der Kochblutagarplatten wurde Tryptic-Soy Agar (Difco, Detroit, USA) nach Vorschrift gelöst und 20 min bei 121° C autoklaviert. Dem auf 80° C abgekühlten Agar wurden 5 % (v/v) steriles Hammelblut beigemengt und der Agar wurde dann für 20 min auf 80° C erhitzt. Die Agarplatten wurden der laufenden Produktion der Nährbodenküche des Hygiene-Instituts entnommen.

2.3.2. Medien zum Nachweis des Serumfaktors (SF)

Die Rezeptur entspricht der der Blutagarplatten. Jedoch wurde dem auf 45° C abgekühlten Agar anstelle von Ham-

melblut die jeweils zu untersuchende Lösung zugesetzt.

2.3.3. Medium zum Nachweis des bakteriellen Exofaktors (AF)

Hierzu wurden die oben beschriebenen Blutagarplatten verwendet.

2.3.4. Medien für die Produktion des AF

Die Produktion des AF durch A. haemolyticus 66124/64 Marburg wurde in verschiedenen definierten Medien sowie in Proteose-Pepton Medium (Difco, Detroit, USA) versucht:

Definiertes Medium für Haemophilus influenzae (Herbst et al., 1955).

Definiertes Medium (HOLLÄNDER, pers. Mitteilung) bestehend aus:

L-Phenylalanin	0,20 %
L-Tyrosin	0,20 %
L-Serin	0,20 %
L-Alanin	0,20 %
L-Cystin	0,05 %
L-Arginin	0,06 %

gelöst in Mineralbasis (KAUFFMANN, 1966) bestehend aus:

NaCl	0,50 %
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,02 %
K_2HPO_4	0,10 %
$(NH_4)H_2PO_4$	0,10 %
a. dest.	100,00 %

Die Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht.

Definierte Medien mit nur einer Energie- und Kohlenstoffquelle:
In Mineralbasis (KAUFFMANN, 1966) wurden jeweils 0,05 M der nachfolgend aufgeführten Substanzen gelöst: ß-Alanin, L-Valin, DL-Arginin, D(+)Glucose, Maltose, Lactose, L-Arabinose, Saccharose, Malat-Na_2-

Salz, Succinat-Na_2-Salz, -Glycerophosphat, Pyruvat-Na-Salz, DL-Lactat-Salz, Butyrat-Salz, 3-OH-Hydroxybutyrat-Salz, Glycerin, m-Inosit, Sorbit, Adonit.

Die definierten Medien wurden durch Filtration sterilisiert.

Proteose-Pepton Medium (WHITE, 1962):

Proteose- Pepton No.3 (Difco, Detroit, USA)	0,20 %
NaCl	0,05 %
a. dest.	100,00 %
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	q.s., pH 7,2

Die Sterilisierung erfolgte für 20 min bei 121° C.

2.4.0. Nachweissysteme

2.4.1. Nachweissystem für den AF

Der Nachweis des AF erfolgte mit einem biologischen Test, der qualitative Aussagen erlaubte. Das optimale Testsystem bestand aus einer mit Suspension von P. pneumotropica A/5 a beimpften Blutagarplatte, auf der die Kolonien einen Abstand von 2-5 mm zueinander haben sollten. Auf diese Platte wurde dann entweder der auf AF-Aktivität zu prüfende Keim in einem Impfstrich aufgetragen (Abb. 2), oder die Platte wurde mit Stanzlöchern versehen, in die eine auf AF-Aktivität zu prüfende Lösung eingetropft wurde (Abb. 2). Die Lösungen wurden vorher sterilfiltriert. Die verwendeten Blutagarplatten stammten aus der laufenden Produktion der Nährbodenküche des Hygiene-Instituts Marburg. Durch den zweitägigen Wechsel der Blutcharge und die benötigte Menge an Platten während des langen Untersuchungszeitraumes war es nicht möglich, immer mit demselben Hammelblut zu arbeiten.
Zur Ausführung des Tests wurde P. pneumotropica A/5 a in Mineralbasis suspendiert. Die Transmission dieser Suspension bei 578 nm wurde vergleichend zu einem Leerwert gemessen. Anhand eines Laborstandards für späteexponentielle Zellen von Haemophilus influenzae wurde die Bakterienkonzentration auf einen optimalen Bak-

teriengehalt von etwa 5 x 10^{-6} mg bakterielle Trokkensubstanz pro ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden 3 ml auf die Blutagarplatte getropft und gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden nun für 2-3 Stunden zum Trocknen in den Brutschrank bei 37° C gestellt. Nach dem Trocknen wurden sie eventuell bei Zimmertemperatur gelagert. Sie waren so auch noch nach 3 Tagen verwendbar.
Die Stanzlöcher wurden mit einem ausgeglühten Edelstahlrohr (5 mm Ø), das mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden war, in den Agar gestanzt.
Von den auf AF-Aktivität zu prüfenden Lösungen wurden jeweils 0,1 ml mit einer Pasteurpipette in die Stanzlöcher getropft. Die Platten wurden danach für 2 Tage bei 37° C bebrütet.
Als positiver Nachweis wurde das Vorhandensein von mindestens einer mit bloßem Auge erkennbaren Kolonie mit einem Flachrand, ohne Berücksichtigung ihrer Größe bewertet.
Zur Vermeidung falsch negativer Aussagen wurden die Tests in mehrfacher Ausführung vorgenommen.

2.4.2. Nachweissystem für den SF

Das Nachweissystem für den SF war demjenigen für den AF bis auf die Zusammensetzung des Nährbodens gleich.

2.5.0. Säulentrennung

Die verwendeten Säulen hatten die Maße 1,5 cm Durchmesser und 40 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser und 80 cm Länge. Sie besaßen einen Kühlmantel, durch den ein Methanol-Wasser-Gemisch von 4°C floß.
Die kleine Säule diente zur Trennung mit Hilfe eines Ionenaustauschers, die große zur Gelfiltration.

2.5.1. Trennung mit DEAE-Sephadex A 50

DEAE-Sephadex ist ein Anionenaustauscher, der durch Einbringung von Diäthylaminoäthylgruppen aus dem zur

Gelfiltration verwendeten Sephadex G 50 entwickelt wurde. Die Austauschergruppen sind über Ätherbrücken an die Glucosebausteine der Dextranketten gebunden. Bedingt durch seine Austauschergruppe ist DEAE-Sephadex A 50 ein schwach basischer Anionenaustauscher. Wie Sephadex G 50 quillt DEAE-Sephadex A 50 in Wasser. Der Quellungsgrad hängt von der Ionenstärke und dem pH des Quellungsmediums ab. Wenn diese zunehmen, nimmt das Quellungsvermögen des Austauschers ab. Durch die Größe seiner Poren, die die Zugänglichkeit der Austauscherguppen bestimmen, hat DEAE-Sephadex A 50 seinen optimalen Trennbereich bei Molekulargewichten von 30 000 - 200 000.
Der empfohlene pH-Bereich liegt bei pH 2 bis pH 9. Die Kapazität des Austauschers nimmt dabei mit steigendem pH ab (Abb. 3).
Für detaillierte Auskünfte über DEAE-Sephadex A 50 sei verwiesen auf MORRIS und MORRIS (1976).
Die Elutionsgeschwindigkeit wurde mit einer Pumpe konstant geregelt. Die Temperatur der Säule war auf 4^{o} C eingestellt. Das Gel stammte ebenso wie das noch zu beschreibende Sephadex G 100 von der Fa. Serva, Heidelberg.

2.5.2 Trennung mit Sephadex G 100

Sephadex G 100 besteht aus vernetzten Dextranketten und ist in der Lage, Moleküle nach ihrem Molekulargewicht zu trennen. Da Sephadex G 100 porös ist, können kleinere Moleküle beim Durchlaufen des Gels immer wieder in die Poren eindringen, während dies für größere Moleküle schwerer oder gar nicht möglich ist. Dadurch haben Moleküle unterschiedlicher Größe eine verschieden lange Trennstrecke und werden deshalb nach verschiedenen Volumina eluiert.
Sephadex G 100 kann Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 4 000 und 150 000 auftrennen.
Für die Interpretation der Elutionskurve gibt es ein rechnerisches und ein graphisches Verfahren. Beim ersteren wird aus folgenden Volumina die Konstante

K errechnet.

$$K = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e: Elutionsvolumen
V_t: Bettvolumen
V_o: Ausschlußvolumen

Dieser Wert K läßt sich als Funktion des Molekulargewichtes darstellen (Abb. 4):

$K = f \cdot (\log MG)$ MG: Molekulargewicht

Mit ihrer Hilfe kann man das Molekulargewicht einer eluierten Substanz bestimmen.
Die zweite Methode ist ein Annäherungsverfahren, das sich auf die Tatsache begründet, daß die Funktion $K = f \cdot (\log MG)$ eine Sigmoid-Kurve ist und in einem weiten mittleren Abschnitt etwa einer Geraden folgt.
Es gilt demnach in mittleren Kurven- bzw. Molekulargewichtsbereichen:

$$V_e = K \times \log MG$$

Man ermittelt den Verlauf dieser Geraden graphisch, indem man Substanzen bekannten Molekulargewichtes eluiert und das Elutionsvolumen gegen das Molekulargewicht aufträgt.
Beide Verfahren ergeben jedoch nur Schätzwerte des Molekulargewichtes, da das Gel eigentlich nach Molekülgröße auftrennt, die nicht nur vom Molekulargewicht, sondern auch von der Substanzklasse abhängt.
Zur Schätzung des Molekulargewichtes wurde das zweite Verfahren angewendet.

2.6.0. Seren

Es wurden zum einen selbstgewonnene Seren von Mensch, Pferd, Huhn und Forelle verwendet. Zum anderen wurden Rinderserum (Behringwerke, Marburg), Meerschweinchen-

serum (BBL, Cockeyville, USA) und durch Polyacrylamidgel gewonnene Serumfraktionen (Behringwerke, Marburg) benutzt.

2.7.0. Chemische Verfahren

2.7.1. Proteinfällung und Proteinbestimmung

Die Proteinfällung wurde mit Ammoniumsulfat durchgeführt. Zur Proteinbestimmung wurde die Biuret-Methode unter Verwendung von KCN (SZARKOWSKA und KLINGENBERG, 1963) verwendet.

2.7.2. Nachweis von Hydrolasen

Zum Nachweis von Hydrolasen wurde ein Verfahren nach BÜRGER (1967) angewendet. Das Prinzip bestand darin, ein Substrat für 3-4 Stunden mit der zu untersuchenden Lösung zu inkubieren und danach mit einer Farbreaktion das Spaltprodukt nachzuweisen. Inkubiert wurde bei 30^{o} C.

2.8.0. Chemikalien

2.8.1. Markerproteine

Die Markerproteine stammten von der Fa. Serva, Heidelberg. Folgende Proteinewurden verwendet:

Rinderalbumin, reinst	MG 67 000
Ovalbumin, reinst	MG 45 000
Myoglobin, reinst	MG 17 800
Cytochrom C, reinst	MG 12 400

2.8.2. Sonstige Chemikalien

Die sonst verwendeten Chemikalien stammten alle von der Fa. E.Merck, Darmstadt- und entsprachen p.a. Qualität.

2.9.0. Geräte

2.9.1. Dialyseschlauch

Es wurde ein Dialyseschlauch Visking 27/32 (Serva, Heidelberg) verwendet. Der Dialyseschlauch hatte eine durchschnittliche Porengröße von 15-20 Å. Er läßt Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von etwa 10 000 bis 15 000 passieren.

2.9.2. Filter

Für die Sterilfiltration wurde ein Filter von Typ Milles, SL GS 025 (Millipore S.A., Buc, Frankreich) benutzt. Er hatte eine mittlere Porengröße von 0,22 um.

2.9.3. Fraktionssammler

Es wurde der Fraktionssammler TYP 3 400 B Radi-RAC (LKB, Bromma, Schweden) verwendet.

2.9.4. Photometer

Zur Registrierung der Extinktion bei 280 nm während der Elution der Gelsäulen wurde ein Uvicord II (LKB, Bromma, Schweden) verwendet.
Alle übrigen photometrischen Bestimmungen wurden mit einem Photometer "Eppendorf" (Netheler & Hinz GmbH, Hamburg) durchgeführt.

2.9.5. Temperaturgradienteninkubator

Der Inkubator wurde im Hygiene-Institut Marburg entwickelt und gebaut (MANNHEIM und WOLF, 1972). Er erzeugt einen linearen Temperaturgradienten zwischen 62,2° C und 5,1° C.

3.0.0. Ergebnisse

3.1.0. Verbreitung des Flachrandformenphänomens

3.1.1. Flachrandkolonienbildende Bakterien

Eine durch Acinetobacter haemolyticus induzierte Bildung von Kolonien mit flachen Randzonen wurde zuerst bei Pasteurella pneumotropica A/5A beobachtet. Auch Bacillus spec. HIM 551-2 induzierte bei diesem Keim Kolonien mit flachen Randzonen. Eine Überprüfung weiterer Pasteurella- und Actinobacillus-Stämme führte zur Entdeckung eines weiteren Flachrandformen bildenen Pasteurella-Stammes: Pasteurella spec. 138021/75. Tab. 5 gibt einen Überblick über die untersuchten Stämme.

3.1.2. Flachrandkolonieninduzierende Bakterien

Nach Entdeckung der AF-Aktivität bei A. haemolyticus 66124/64 wurden auch andere Acinetobacter-Stämme auf AF-Aktivität überprüft. Wie aus Tab. 4 ersichtlich, erwiesen sich alle proteolytischen Stämme als aktiv, während alle nicht proteolytischen Stämme keine AF-Aktivität besaßen.
Als weiterer Produzent des AF wurde ein zufällig entdeckter Bacillus spec. HIM 551-2 bekannt. Seine genauere Charakterisierung findet sich in Tab. 2.

3.2.0. Optimierung des Testsystems

3.2.1. Bestimmung der optimalen Einsaatdichte von Pasteurella

Während der ersten Versuche wurde die Beobachtung gemacht, daß die Bildung von Kolonien mit flachen Randzonen von der Einsaatdichte der Pasteurella abhängig ist. Wenn die Kolonien zu dicht lagen, konnten keine Flachrandkolonien gebildet werden, ebenso wenn sie zu weit voneinander entfernt waren - wobei hier die

Konzentrationsverluste an AF ausschlaggebend sein dürften. Da dies die Empfindlichkeit des Testsystems erheblich schwanken ließ, wurde versucht, eine optimale, reproduzierbare Einsaatdichte zu ermitteln. Hierzu wurde P. pneumotropica A/5a von der Blutagarplatte in Mineralbasis überimpft und der Bakteriengehalt der Suspension im Photometer bestimmt. Dann wurde die Suspension in Zehnerschritten bis 10^{-7} verdünnt und 0,3 ml gleichmäßig auf einer Blutagarplatte verteilt. Diese wurde nach dem Trocknen mit A. haemolyticus 66124/64 beimpft und bebrütet.
Als Einheit für die optimale Einsaatdichte wurde der Bakteriengehalt der Mineralbasis in mg/ml bakterieller Trockensubstanz verwendet.
Aus dem nachfolgenden Versuchsprotokoll ist ersichtlich, daß der optimale Bakteriengehalt etwa bei 5×10^{-9} mg Trockensubstanz/ml liegt.

Verdünnung	bakt. Trockensubstanz (mg/ml)	Kolonieabstand (mm)	Flachrandkolonien
10^{-2}	5×10^{-7}	1	-
10^{-3}	5×10^{-8}	1	+
10^{-4}	5×10^{-9}	3	++
10^{-5}	5×10^{-10}	8	++
10^{-6}	5×10^{-11}	20	-
10^{-7}	5×10^{-12}	50	-

3.2.2. Temperaturabhängigkeit des Wachstums von P. pneumotropica A/5a und A. haemolyticus 66124/64

Beide Keime wurden in Proteose-Pepton Medium in einem Inkubator mit linearem Temperaturgradienten zwischen $C_3 = 15,5^{\circ}$ C und $C_{17} = 45,7^{\circ}$ C über 26 Stunden bebrütet. In fünf Messreihen wurde jeweils die Transmissi-

on des Mediums bestimmt.
Wie aus Abb. 5 ersichtlich, wächst A. haemolyticus 66124/64 bei 24° C besser als P. pneumotropica A/5a. Damit ist es notwendig, auf einer mit beiden Keimen beimpften Agarplatte ein überwiegendes Wachstum von A. haemolyticus 66124/64 zu erzielen, und damit dem Keim Gelegenheit zu geben, den AF zu produzieren, bevor sich Pasteurella-Kolonien gebildet haben.

3.2.3. Effekt einer Zeitvorgabe für A. haemolyticus 66124/64 vor P. pneumotropica A/5a

Ausgehend vom Ergebnis des Versuchs 3.2.2. wurden mit Pasteurella beimpfte und getrocknete Blutagarplatten mit A. haemolyticus beimpft und dann unterschiedlich lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bevor sie bei 37° C bebrütet wurden.
Es zeigte sich, daß Vorgabezeiten von mindestens 2 Stunden die Ausbeute an Kolonien mit flachen Randzonen erhöhten.

3.3.0. Rolle und Natur des Serumfaktors SF

3.3.1. Notwendigkeit von Blut oder Serum zur Erzeugung von Flachrandkolonien

Weil die ersten Flachrandkolonien auf Blutagarplatten entdeckt worden waren und das Phänomen auf blutfreien Nährböden nicht zu erzeugen war, lag die Vermutung nahe, daß das Blut oder einer seiner Bestandteile zur Erzeugung von Flachrandkolonien notwendig ist. Hierzu wurden verschiedene Nährmedien mit P. pneumotropica A/5a und A. haemolyticus 66124/64 beimpft. Aus der folgenden Aufstellung ist zu ersehen, daß zur Erzeugung von Kolonien mit flachen Randzonen ein Serumfaktor notwendig ist. Dieser ist hitzelabil, da er bei Erwärmen auf 80° C zerstört wird.

Nährboden	Flachrandkolonien
Tryptic Soy Agar	-
Blutagar	+
Kochblutagar (80° C, 20 min)	-
Humanserumagar (10 %, v/v)	+

3.3.2. Verbreitung des SF im Serum verschiedener Tiere

Mit verschiedenen gekauften und selbst hergestellten Seren wurden Nährböden gefertigt und mit P. pneumotropica A/5a sowie A. haemolyticus 66124/64 beimpft. Die Übersicht zeigt, daß der Serumfaktor bei allen untersuchten Wirbeltieren gefunden wurde, -er also ein Merkmal höher entwickelter Säugetiere ist.

Serumart	Konzentration	Flachrandkolonien
Humanserumagar	10 % (v/v)	+
Rinderserumagar	10 % (c/v)	+
Pferdeserumagar	10 % (v/v)	+
Meerschweinchens.	10 % (v/v)	+
Forellenserumagar	5 % (v/v)	+

3.3.3. Weitere Charakterisierung des SF

Orientierende Versuche mit Humanserumfraktionen, die durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese gewonnen worden waren (freundlicherweise von Herrn Dr. O.Zwisler, Behringwerke AG, Marburg, zur Verfügung gestellt), zeigten, daß die Flachrandkolonien induzierende Aktivität in der α_2- und ß-Globulinfraktion wanderte, und durch Bestandteile der γ-Globulinfraktion inhibiert wird. Dieser Befund wurde in der vorliegenden Unter-

suchung nicht weiter verfolgt.

3.4.0. Charakterisierung des von A. haemolyticus 66124/64 produzierten Faktors (AF)

3.4.1. Produktionsbedingungen

Zunächst wurde versucht, den Faktor in einem geeigneten Medium zu produzieren. Dieses Medium sollte möglichst wenige störende Fremdproteine enthalten, die später wieder vom AF abgetrennt werden müßten. Von den verschiedenen zur AF-Produktion herangezogenen Medien erwies sich nur das peptid-haltige, komplexe Medium, Proteose-Pepton, als geeignet.
Die A. haemolyticus Kulturen wurden darin bei 37° C unter halbaeroben Bedingungen für 24 Std. bebrütet. Aus dem Medium wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10 min bei 10 000 x g abgetrennt.

3.4.2. Effekt von Sauerstoff auf die Ausbeute an AF

Jeweils 70 ml Proteose-Pepton Medium wurden in einem 300 ml fassenden Erlenmeyerkolben für 24 Std. bei 37°C bebrütet. Ein Ansatz wurde stehend, ein weiterer Ansatz im Rundschüttler bebrütet.
Von den auf gleiche Proteinkonzentration eingestellten Mediumüberständen wurden Verdünnungsreihen angelegt und auf ihre AF-Aktivität geprüft.
Die nachfolgende Übersicht zeigt, daß die geschüttelte Kultur zwar mehr AF-Aktivität besaß als die stehend bebrütete, jedoch ist aus diesem Ergebnis nicht zu ersehen, ob dieser Effekt allein auf vermehrtes Bakterienwachstum oder auch auf erhöhte AF-Produktion durch das einzelne Bakterium zurückzuführen ist. Die Aktivität des Kulturüberstandes entspricht in beiden Fällen der Zellkonzentration in der Kultur.

Kultur	Bakterientrocken-substanz (g/l)	kleinste AF-aktive Proteinkonz. (mg/ml)
geschüttelt	0,870	0,3
stehend	0,214	1,5

3.4.3. Wärmestabilität des AF im Kulturüberstand

Sterilfiltrierter Kulturüberstand, dessen kleinste noch AF-aktive Proteinkonzentration bestimmt worden war, wurde für 45 min verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Dies geschah in einem Wasserbad mit steigenden Temperaturen von 40° bis 50° C. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand in Verdünnungsreihen auf AF-Aktivität untersucht und die kleinste noch AF-aktive Proteinkonzentration ermittelt.
Wie Abb. 6 zeigt, erwies sich der AF als wärmelabil. Bei Erwärmung auf 44° C fiel die Aktivität auf 1/1o des Ausgangswertes ab.

3.4.4. pH-Stabilität des AF im Kulturüberstand

Diese Untersuchung sollte vor allem darüber Hinweise ergeben, inwieweit die später geplante Säulentrennung innerhalb enger pH Grenzen zu erfolgen hätte.
Jeweils 2 ml Kulturüberstand wurden mit HCl bzw. NaOH auf einen bestimmten pH eingestellt und anschließend für 4 Std. bei 4° C aufbewahrt.
Dann wurde der Überstand auf seinen Ausgangs-pH zurücktitriert und sterilfiltriert. Schließlich wurden die Proben in Verdünnungsreihen auf ihre AF-Aktivität geprüft.
Untersucht wurde die Veränderung der AF-Aktivität im Bereich von pH 4 bis pH 10.
Dabei erwies sich der AF als in einem weiten pH-Bereich ziemlich stabil. Aus Abb. 7 ist der Verlauf der AF-Aktivitätsänderung zu ersehen. Die AF-Aktivi-

tät war im Bereich von pH 7 bis pH 8 am größten.

3.4.5. Stabilität des AF im Kulturüberstand bei 4°C

Hierzu wurde sterilfiltrierter Kulturüberstand bei 4° C im Kühlschrank gelagert, und in Abständen die AF-Aktivität in Verdünnungsreihen bestimmt.
Es zeigte sich, daß der AF unter diesen Bedingungen sehr stabil ist. Wie aus Abb. 8 ersichtlich ist, sank die Aktivität im Kulturüberstand im Zeitraum von 20 Wochen nur auf 1/4 des Ausgangswertes ab.

3.4.6. Proteinfällung im Kulturüberstand mit Ammoniumsulfat

Es wurden jeweils 20 ml Kulturüberstand aus derselben Kultur mit Ammoniumsulfat versetzt. Die Lösungen waren 40 % bzw. 50 % bzw. 60 % bzw. 70 % gesättigt. Nach einer Stunde Sedimentation bei 4° C wurde zentrifugiert (10 min. bei 10 000 x g). Das Sediment wurde in 4 ml a. dest. aufgenommen und 12 Std. bei 4° C gegen a. dest. dialysiert. Nach der Proteinbestimmung wurde die Lösung sterilfiltriert.
Alle Lösungen wurden mit Mineralbasis auf die gleiche Proteinkonzentration gebracht. Von jeder Probe wurde nun die AF-Aktivität in einer Verdünnungsreihe bestimmt.
Die größte Aktivität hatte die Probe des Sediments bei 50 % Salzsättigung. Die spezifische Aktivität betrug 5×10^{-2} mg/ml.

3.4.7. Trennung auf DEAE-Sephadex A 50

Der Austauscher wurde im Startpuffer 0,01 M Tris-HCl pH 7,4 für zwei Stunden in siedendem Wasser gequollen. Durch diese Behandlung war das Gel auch bis auf eventuell vorhandene Sporen keimfrei.
Danach wurde das Gel steril im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

Die Säule wurde nach der Methode von FISCHER (zitiert nach MORRIS & MORRIS, 1976) blasenfrei gefüllt. Nachdem sich das Gel gesetzt hatte, ergaben sich bei den verschiedenen Trennungen Bettvolumina zwischen 20 ml und 40 ml. Bei den einzelnen Versuchen wurden 2 bis 6 ml des 50 % Ammoniumsulfatsediments aufgetragen, was einer Gesamtproteinkonzentration von 20 bis 60 mg entsprach.
Die Elution wurde diskontinuierlich mit einem Ionengradienten durch Zugabe von NaCl zum Startpuffer durchgeführt.
Nach Messung der Absorption bei 280 nm wurde das Eluat in Fraktionen von 3 ml gesammelt. Innerhalb von 30 min wurde das Eluat dann sterilfiltriert und im Kühlschrank gelagert.
Die AF-Aktivität der Proben wurde in Verdünnungsreihen bestimmt. Bei der Elution wurde folgende Salzkonzentrationen verwendet: 0,00 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,2M NaCl.
Der AF wurde im Bereich von 0,05 M bis 0,1 M NaCl eluiert.
Die spezifische Aktivität betrug $1,5 \times 10^{-2}$ mg/ml. Dies entspricht einer 3-fachen Anreicherung gegenüber dem 50% Ammoniumsulfatsediment und einer 20-fachen Anreicherung gegenüber dem Kulturüberstand.

3.4.8. Wärmestabilität des AF im DEAE-Eluat

Es wurden wie unter 3.4.3. beschrieben, Proben in einem Wasserbad für 45 min auf Temperaturen zwischen 40° C und 50° C erhitzt und danach ihre AF-Aktivität in Verdünnungsreihen bestimmt. Wie Abb. 9 zeigt, erwies sich der AF im DEAE-Eluat nicht als wärmelabiler als im Kulturüberstand.

3.4.9. Effekt von Pronase auf den AF im DEAE-Eluat

50 µg/ml Pronase wurde in 0,01 M Tris-HCl Puffer, pH 7,4, aufgenommen und bei 37° C für eine Stunde in-

kubiert.
Die Lösung wurde nun sterilfiltriert und 1 ml davon zu 5 ml DEAE-Eluat gegeben. Diese Probe wurde für mehrere Stunden bei 37° C aufbewahrt und ihre AF-Aktivität danach vergleichend zu einer nicht mit Pronase versetzten Lösung gemessen.
Dabei ergab sich, daß die Aktivität in der mit Pronase versetzten Probe verschwunden war.

3.4.10. Hydrolasen-Aktivität des AF-aktiven DEAE-Eluats

Es wurden mit der von BÜRGER (1966) entwickelten Methode Tests zum qualitativen Nachweis von Hydrolasen durchgeführt.
Dabei wurde untersucht, ob sich im AF-aktiven DEAE-Eluat Peptidase-, Esterase-, Lipase- und Glucosidase-Aktivität nachweisen ließ.
Wie aus Tab.6 zu ersehen ist, enthielt das Eluat sowohl Peptidase- als auch Esterase- und Lipase-Aktivität. Somit war eine Identifizierung des AF als Enzym auf dieser Trennstufe nicht möglich.

3.4.11. Schätzung des Molekulargewichtes des AF

Das Molekulargewicht des AF wurde durch Gelfiltration mit Sephadex G 100 bestimmt.
Sephadex G 100 wurde zunächst in 0,6 M Sørensen-Phosphat Puffer, pH 7,6, für 5 Std. in siedendem Wasser gequollen. Da der Quellvorgang in einem Einweckglas erfolgte, konnte man sich leicht vom richtigen Entgasen des Geles überzeugen. Bis auf eventuell vorhandene Sporen war das Gel nach dem Quellen keimfrei.
Die Säule wurde nach der Methode von FISCHER (zitiert nach MORRIS und MORRIS, 1976) blasenfrei gepackt. Dann wurde für 24 Std. mit o,6 M Sørensen-Phosphat Puffer eluiert, damit sich das Gel setzen konnte. Das Gel stand unter einem hydrostatischen Druck von 30 cm Wassersäule.

Um das Gel vor bakterieller Zersetzung zu schützen, wurde die Säule zwischen den Trennläufen mit Natriumazid in 0,6 M Sørensen-Phosphat Puffer gespült.
Die Schätzung des Molekulargewichtes wurde mit Hilfe von Markerproteinen bekannten Molekulargewichtes durchgeführt.
Nachdem die Säule geeicht war, wurden 1 ml des 50 % Ammoniumsulfatsediments mit einer Proteinkonzentration von 25 mg/ml zusammen mit 5 mg Myoglobin und 15 mg Ovalbumin aufgetragen.
Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 27 ml/ Std..
Nach Messung der Absorption bei 280 nm wurde das Eluat in Proben von 3 ml in einem Fraktionssammler aufgefangen. Die Proben wurden innerhalb von 30 min sterilfiltriert und dann im Kühlschrank bei 4° C gelagert.
Das Eluat wurde dann in Verdünnungsreihen auf seine AF-Aktivität geprüft.
Abb.10 zeigt die Kurve der Absorption bei 280 nm mit der Lage der Elutionsmaxima für Ovalbumin, MG 45 000, und Myoglobin, MG 17 800,.Das Absorptionsmaximum der AF-Aktivität wird durch die Maxima der Markerproteine überlagert, so daß das Molekulargewicht zwischen dem vom Ovalbumin und Myoglobin liegt.
Zur genaueren Ermittlung des Molekulargewichtes wurde das Elutionsvolumen des AF in die Eichkurve eingetragen (Abb.11).
Das so ermittelte Molekulargewicht beträgt ca. 34 000.

4.0.0. Diskussion

4.1.0. Reversible Wuchsformvariation bei zwei Pasteurella-Stämmen

Wie im einleitenden Kapitel dargestellt, sind Wuchsformvariationen bei vielen Bakterien bekannt und untersucht worden. Dabei überwiegen die Erkenntnisse über die Mechanismen genetisch fixierter Wuchsformvariationen. Für den speziellen Fall der Pasteurellen liegen bisher, soweit dem Autor bekannt, nur Arbeiten über genetisch bedingte Wuchsformvariationen vor, oder solche, bei denen die verfügbaren Daten auf einen solchen Mechanismus hindeuten.

Zwei Arbeiten, in denen morphologisch sehr ähnliche Wuchsformen bei Pasteurellen beschrieben wurden, sind hier von besonderem Interesse. Bei beiden Beobachtungen handelt es sich um Wuchsformen, die wie die hier beschriebene Wuchsformvariation nicht in die bei Pasteurellen bekannten Kategorien M/S/S^r/R eingeordnet werden können.

Zum einen beschrieben TACU und TACU (1968) "ringförmige" Pasteurella-Kulturen, die sie auf Schrägagar aus experimentell infizierten Mäusen und Tauben isolierten.

Die Stämme gehörten teilweise dem S-Typ und teilweise dem R-Type an. Die Zellen zeigten lichtmikroskopisch keine Besonderheiten. Sowohl durch mehrfaches Überimpfen auf gewöhnlichen Nähragar, als auch durch Tierpassagen kehrten die Kolonien zu ihrer normalen Morphologie zurück.

Möglicherweise handelt es sich hierbei um Überwucherung der genetisch bedingten "ringförmigen" Variante durch die glatte Variante.

Leider sind die verfügbaren Daten über das von TACU und TACU beschriebene Phänomen nicht ausreichend, um eine genauere Abgrenzung gegenüber dem hier beobachteten Phänomen der Flachrandkolonien bei zwei Pasteurella-Stämmen vorzunehmen.

Es scheint so, als ob es sich jedoch nur um eine morphologische Verwandtschaft der beiden Phänomene handelt.

Die zweite Beobachtung stammt von HENRIKSEN und FRØHOLM (1975). Sie beschrieben bei einem aus einem menschlichen Mittelohr isolierten Stamm von P. multocida "spreading and corroding colonies", sowie die dazu gehörende " non spreading" Variante. Es mißlang ihnen, die eine in die andere zu überführen. Aus dem besagten ist es wahrscheinlich, daß es sich hierbei um eine genetisch fixierte Wuchsformvariation handelt.

HENRIKSEN und FRØHOLM (1975) konnten zeigen, daß die Zellen der "spreading" Variante durch polare Fimbrien von denen der "non spreading" Variante zu unterscheiden waren. Mit diesen Fimbrien können sich die Zellen am Nährboden festheften und sich dann mit einer Kippbewegung fortbewegen. Ähnliche Kippbewegungen bei mit polaren Fimbrien ausgestatteten Zellen sind auch bei Moraxella nonliquefaciens, M. bovis und M. kingii (HENRICHSEN et al., 1972) sowie bei Streptococcus sanguis (HENRIKSEN und FRØHOLM, 1975) beschrieben. Die Abbildungen dieser "spreading and corroding colonies" zeigen eine sehr große morphologische Ähnlichkeit mit den hier beschriebenen Flachrandkolonien. Bei der hier beschriebenen Wuchsformvariation handelt es sich jedoch um einen rein phänotypischen Vorgang bei Pasteurella spec. T 138021/75 und P. pneumotropica A/ 5a. Im Gegensatz zu der von HENRIKSEN und FRØHOLM (1975) beschriebenen Wuchsformvariation ist es im hier untersuchten Fall so, daß der Übergang von der normalen, glatten Kolonie in die Flachrand-Kolonieform und zurück innerhalb von einer Kulturpassage durch gezielte Veränderung des Kulturmediums erreicht werden kann. Die Flachrandkolonien werden durch die gleichzeitige Gegenwart eines bakteriellen Exofaktors AF sowie eines Serumfaktors SF induziert. Läßt man einen der beiden Faktoren fort, so wachsen die Pasteurellen sofort wieder in der normalen, glatten Koloniemorpho-

logie.
Dies deutet darauf hin, daß die Wuchsformvariation durch direkten Eingriff in den Stoffwechsel der Pasteurellen erzeugt wird.
Nach den vorliegenden Befunden ist es wahrscheinlich, daß der Serumfaktor SF in allen geprüften Vertebratenseren präformiert vorliegt, aber erst nach Beseitigung von Seruminhibitoren durch den bakteriellen Exofaktor AF aktiv werden kann.
Dieser Frage wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen.
Ein anderer, hier nur am Rande interessierender Aspekt ist der der Mechanik der Flachrandkolonienbildung. Lichtmikroskopische Untersuchungen der Zellen ergaben hierzu keinerlei Hinweise.
Die Arbeit von HENRIKSEN und FRØHOLM über die "spreading and corroding colonies" bei einem Stamm von P. multocida wirft jedoch die Frage auf, ob die Zellen der Flachrandkolonien auch polare Fimbrien besitzen und sich eventuell auch durch Kippbewegungen fortbewegen Können.
Dieses müßte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen überprüft werden.

4.2.0. Der Exofaktor (AF) von A. haemolyticus 66124/64

Neben der Beschreibung wesentlicher Daten zur Einordnung und Charakterisierung des Flachrandkolonienphänomens als Wuchsformvariation war es ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, den bakteriellen Exofaktor AF zu charakterisieren.
Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen handelt es sich beim AF um ein basisches Molekül, das Proteincharakter besitzt. Wahrscheinlich ist es ein Exoenzym. Für diese Deutung sprechen folgende Befunde:

- Die Bildung des AF findet in Proteose-Pepton-Medium, jedoch nicht in definierten Aminosäuremedium statt. Eine gleiche Beobachtung machten BREUIL und KUSHNER (1974), als sie eine extrazelluläre Lipase eines

Acinetobacter-Stammes untersuchten.
Demnach könnte es sich beim AF um ein induzierbares Exoenzym handeln.
Dieser Befund erschwert allerdings auch die Reinigung des AF, da man die Medium-Peptide abtrennen muß.

- Der AF ist in der durch Ammoniumsulfatfällung erhältlichen Fraktion des Mediumüberstandes enthalten.
- Die AF-Aktivität wird durch das proteolytische Enzym Pronase zerstört.
- Das Molekulargewicht des AF liegt nach Schätzung mit Hilfe von Sephadex G 100 bei ca. 34 000.

Wie der Versuch zum Nachweis von Hydrolasen zeigte, müßte der AF noch weiter gereinigt werden, bevor eine endgültige Stellungnahme zu der hier vorgebrachten "Enzymhypothese" abgegeben werden kann.
Bis jetzt wurde die AF-Aktivität bei einer Reihe von proteolytischen Acinetobacter-Stämmen sowie bei einem proteolytischen Bacillus nachgewiesen. Dies läßt erwarten, daß sich die AF-Aktivität noch bei anderen proteolytischen Bakterien nachweisen lassen wird.

5.0.0. Zusammenfassung

Es wurde eine phänotypische, reversible Wuchsformvariation bei Pasteurella spec. T 138021/75 sowie P. pneumotropica A/5a beschrieben.
Diese als Flachrandkolonien bezeichnete Veränderung der Wuchsform wird in Zusammenwirken mit einem Serumfaktor SF von einem bakteriellen Exofaktor AF induziert.
Außer den beiden oben aufgeführten Pasteurella-Stämmen konnten keine weiteren Flachrandkolonienbildner gefunden werden.
Der Serumfaktor SF war in allen geprüften Vertebratenseren enthalten. Er wanderte in der α_2- und ß-Globulinfraktion und wird durch Bestandteile der γ-Globulinfraktion inhibiert.
Der bakterielle Exofaktor AF wird von allen proteolytischen Acinetobacter-Stämmen, die untersucht wurden, gebildet, ebenso von einem Bacillus spec.-Stamm HIM 551-2.
Der vom A. haemolyticus 66124/64 gebildete Faktor wurde näher untersucht. Es handelt sich um ein basisches Molekül mit Proteincharakter, wahrscheinlich ein Exoenzym. Er wird nur im komplexen Medium produziert und ist wärmelabil. Sein Molekulargewicht liegt etwa bei 34 000.

6.0.0. Tabellen und Abbildungen

Tab. 1: Mikromorphologische und biochemische Charakterisierung von Acinetobacter haemolyticus 66124/64

Koloniemorphologie

Kontur: rund, regelmäßig

Oberfläche: glatt

Profil: halbkugelig

Größe: 1 mm/ 24 Std.

Mikromorphologie im Grampräparat

Gramreaktion: negativ

From der Stäbchen: gerade, kurz, z.T. lange Fäden

Verhältnis von Breite zu Länge: 1:1,5 bis 1:3

Endosporen: keine

Kulturell-biochemische Leistungen

TMPD-Oxydase	-	Nitratreduktion	-
Hämolyse von Schaferyth.	+	Restnitrat	+
OF-Glucose	oxid.	Gelatineverflüss.	+
OF-Basis	-	Stärkeabbau	+
Kligler-Medium		Äsculinabbau	-
Schrägfläche, pH	alk.	Beweglichkeit	-
Stichanteil, pH	-	Wachstum auf/in:	
Gasbildung	-	Trypsinbouillon	diffus
H_2S-Bildung	-	Thioglykolat	aerob
Indolproduktion	-	Leifsonagar	-
Ureaseaktivität	-	Ammonium-Citrat	(+)

Fortsetzung Tab. 1

Säurebildung aus:			
D(+)Glucose	+	D(+)Saccharose	-
D(+)Galactose	+	Maltose	-
D(-)Fructose	-	Trehalose	-
D(-)Mannose	+	Salizin	-
L(-)Sorbose	-	Mannit	-
L(+)Arabinose	+	Sorbit	-
D(+)Xylose	+	Inosit	-
L(+)Rhamnose	-	Adonit	-
Raffinose	-	Dulcit	-
D(+)Lactose	-		

Die kulturell-biochemischen Leistungen wurden nach Methoden getestet, wie sie bei KAUFFMANN (1966) und EDWARDS und EWING (1972) zitiert sind.

Tab. 2: Mikromorphologische und biochemische Charakterisierung des Flachrandkolonien induzierenden Bacillus spec. HIM 551-2

Koloniemorphologie

Kontur: unregelmäßig

Oberfläche: rauh

Profil: flach-spitz-erhaben

Farbe: grau-weiß

Größe: 4 mm/ 24 Std.

Mikromorphologie im Grampräparat

Gramreaktion: positiv

Form der Stäbchen: kokkoid

Anordnung der Zellen: einzeln, in Ketten

Verhältnis von Breite zu Länge: 1:1,3

Form der Endosporen: oval

Lage der Endosporen: zentral

Auftreibungen der Zelle: keine

Kulturell-biochemische Leistungen

TMPD-Oxidase	+	Nitratreduktion	-
Katalase	+	Restnitrat	+
Hämolyse von Schaferyth.	+	Gelatineverflüss.	+
Kligler-Medium		Stärkeabbau	+
Schrägfläche, pH	alk.	Äsculinabbau	+
Stichanteil, pH	sauer	Methylrotreaktion	+
Gasbildung	-	Beweglichkeit	+
H_2S-Bildung	-	Malonat, Alk.	+
Indolproduktion	-	Wachstum in	
Ureaseaktivität	-	Ammonium-Citrat	+

Fortsetzung Tab. 2

Säurebildung aus:

D(+)Glucose	+	D(+)Saccharose	-
D(+)Galactose	-	Maltose	+
D(+)Fructose	+	Trehalose	+
D(-)Mannose	-	Salizin	+
L(+)Arabinose	-	Mannit	-
D(+)Xylose	-	Sorbit	-
L(+)Rhamnose	-	Inosit	-
Raffinose	-	Adonit	-
D(+)Lactose	-	Dulcit	-
		d-Tartrat	-

Die kulturell-biochemischen Leistungen wurden nach Methoden getestet, wie sie bei KAUFFMANN (1966) und EDWARDS und EWING (1972) zitiert sind.

Tab. 3: Mikromorphologische und biochemische Charakterisierung von Pasteurella pneumotropica A/5a

Koloniemorphologie

Kontur: rund, glatt

Oberfläche: glatt

Profil: halbkugelig

Farbe: grau-weiß

Größe: o,5 mm/24 Std.

Mikromorphologie im Grampräparat

Gramreaktion: negativ

Form der Stäbchen: gerade, kurz

Anordnung der Zellen: kurze Ketten, einzeln

Verhältnis von Breite zu Länge: 1:2

Endosporen: keine

Kulturell-biochemische Leistungen

TMPD-Oxydase	(+)	Nitratreduktion	+
Hämolyse von Schaferyth.	-	Restnitrat	-
OF-Glucose	ferm.	Gelatineverflüss.	-
OF-Basis	ferm.	Stärkeabbau	-
Kligler-Medium		Äsculinabbau	-
Schrägfläche, pH	alk.	Beweglichkeit	-
Stichanteil, pH	sauer	Wachstum auf/in:	
Gasbildung	-	Trypsinbouillon	flockig
H_2S-Bildung	-	Thioglykolat	aerob
Indolproduktion	+	Leifsonagar	-
Ureaseaktivität	+	Ammonium-Citrat	(+)

Fortsetzung Tab. 3

Säurebildung aus:			
D(+)Glucose	(+)	D(+)Saccharose	+
D(+)Galactose	(+)	Maltose	+
D(-)Fructose	(+)	Trehalose	-
D(-)Mannose	(+)	Salizin	-
L(-)Sorbose	-	Mannit	-
L(+)Arabinose	-	Sorbit	-
D(+)Xylose	-	Inosit	-
Rhamnose	-	Adonit	-
Raffinose	-	Dulcit	-
D(+)Lactose	-		

Die kulturell-biochemischen Leistungen wurden nach Methoden getestet, wie sie bei KAUFFMANN (1966) und EDWARDS und EWING (1972) zitiert sind.

Tab. 4: Vorkommen des Pasteurella-Flachrandkolonien induzierenden bakteriellen Faktors AF bei Vertretern der Gattung Acinetobacter

Species[1)]	Serovar[2)]	Stamm	Sammlungs-Nr.[3)] (HIM)	AF-Aktivität
A. haemolyticus	4c	90196/65	145-2	+
"	4c	66124/64	146-2	+
"	5b	58290/64	143-1	+
"	6b	-	141-1	+
"	6f	(A-165 I.P.)	100-1	+
"	7d	(53116 I.P.)	234-6	+
"	8c	(5371 I.P.)	100-2	+
"	9b	(5361 I.P.)	243-3	+
"	-	NCTC 8698	232-3	+
A. haemolyticus ssp. haemolyticus	2b	2446/60	191-4	+
A. haemolyticus ssp. alcaligenes	3b	2181/61	145-1	+
A. conjunctivae	1a	231/61	237-1	+
"	1a	544/60	142-1	+
A. mucosus	-	M 215 Köln	331-3	-
"	-	3516/60	21-1	-
"	-	NCTC 10303	-	-
"	-	77350/66	123-6	-

Die Austestung der AF-Aktivität erfolgte auf Blutagar bei 37°C mit Pasteurella pneumotropica A/5a als Flachrandkolonienbildner.

1) Speciesbezeichnung nach MANNHEIM und STENZEL (1962, 1963)

2) Serovarbezeichnung nach MANNHEIM (1962)

3) Abkürzungen: HIM: Hygiene-Institut, Marburg; NCTC: National Collection of Type Cultures, London, England

Tab. 5: Flachrandkolonienbildung bei Vertretern der Gattungen Actinobacillus und Pasteurella

Species	Stamm	Sammlungsnummer	Flachrandkolonien-bildung
Actinobacillus equuli	A.L. Sheather, Foal	NCTC 3365	-
A. equuli	W.C. Miller, PM 30+53 (D108)	NCTC 8529	-
A. actinomycetemcomitans	P. Holm, 120/48-49 (3)	NCTC 9709	-
A. actinomycetemcomitans	P. Holm, 277/49-50 (8)	NCTC 9710	-
A. ligneresii	P.H. Martin, CM 2	NCTC 4976	-
A. ligneresii	L. Thomson 1	NCTC 4189	-
Pasteurella bettii	D.G. Hollis, 41-5568	NCTC 10535	-
P. anatipestifer	D.W. Bruner	ATCC 11845	-
P. haemolytica	B.J. Shreeve, S 5R	NCTC 10610	-
P. haemolytica	J.A. Watt, 1266/56 A&B	NCTC 9380	-
P. mastitidis	E.A. Tunnicliff, B 31 (4540)	ATCC 11845	-
P. multocida	G.R. Carter, T 4976	HIM 449-1	-
P. multocida	H. Schütze, HS	NCTC 3195	-
P. pneumotropica	A/5 a	HIM	+
P. pneumotropica	E. Jawetz, M.8.29.48.	NCTC 8141	-
P. pneumotropica	M.T. Parker, 54818	NCTC 8284	-

Fortsetzung Tab. 5

P. pneumotropica	F.E. Andre, 9022	NCTC 10633	-
P. pneumotropica	R.G. Wyllie, C 57	ATCC 12555	-
P. spec.	T 138021/75	HIM 588-7/8	+
P. spec., BL-group	M.S. Jayaraman, I	NCTC 10547	-
P. spec., BL-group	M.S. Jayaraman, III	NCTC 10549	-
P. spec., BL-group	M.S. Jayaraman, VII	NCTC 10553	-

Die Flachrandkolonienbildung wurde auf Blutagar mit Acinetobacter haemolyticus 66124/64 als AF-Produzent bei 37° C getestet.

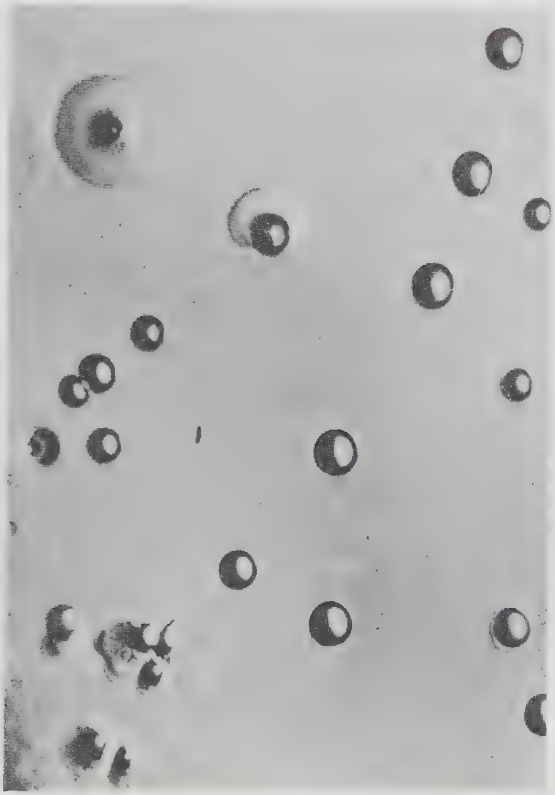
1) Abkürzungen: NCTC= National Collection of Type Cultures, London, England; ATCC= American Type Culture Collection, Rockville, USA; HIM= Bakterienstammsammlung des Hygiene-Instituts Marburg

Tab. 6: Hydrolasenaktivität des AF-aktiven DEAE-Sephadex Eluats

Substrat	enzym. Aktivität
D,L-Alanin-ß-naphtylamid	-
L-Leucin-ß-naphtylamid	-
L-Cystin-di-ß-naphtylamid	-
N-(α-Naphtyl)-D,L-Glutamin	-
L-Leucin-p-nitroanilid	+
N-Carbo-ß-naphtoxy-D,L-phenylalanin	+
Äsculin	-
Salizin	-
Indoxyl-ß-D-glucosid	-
α-Naphtylacetat	+
Caprylsäure-ß-naphtylester	+

Die Hydrolaseaktivität wurde nach der von BÜRGER (1967) entwickelten Methode gestestet.

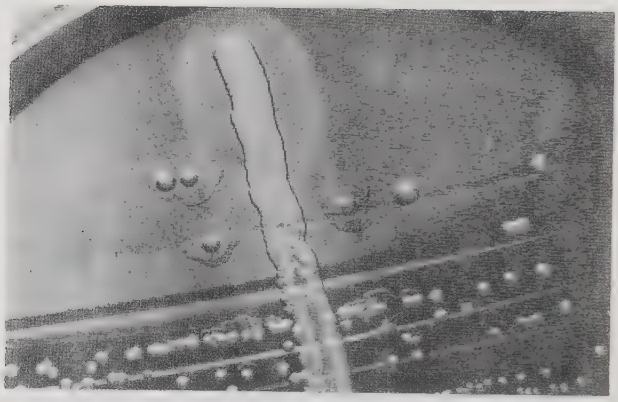
Abb. 1: Normale Glattformen und Flachrandformen von Pasteurella pneumotropica A/ 5a



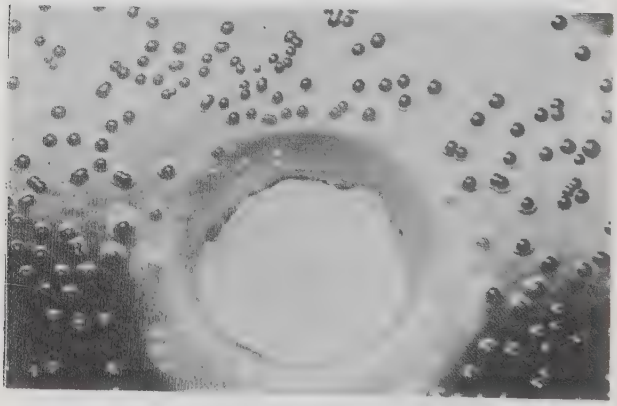
Abgebildet ist sowohl die normale, glatte Wuchsform von P. pneumotropica A/5a, sowie die durch A. haemolyticus 66124/64 induzierten Flachrandkolonien (oben und unten links).

Abb. 2: Nachweisverfahren für den AF

a)



b)



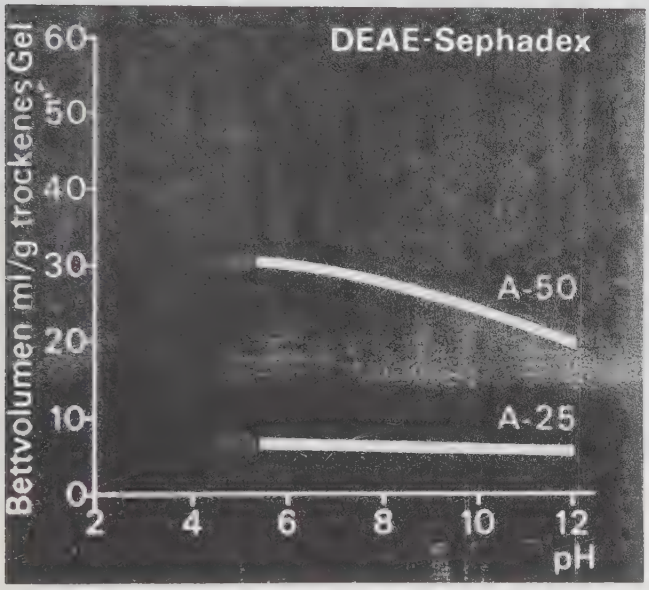
Der Nachweis des AF wird in zwei unterschiedlichen Verfahren auf Blutagar geführt.

a) A. haemolyticus 66124/64 im Impfstrich, P. pneumotropica A/5a in Einzelkolonien.

b) AF-haltige Lösungen in den Stanzlöchern, P. pneumotropica A/5a in Einzelkolonien.

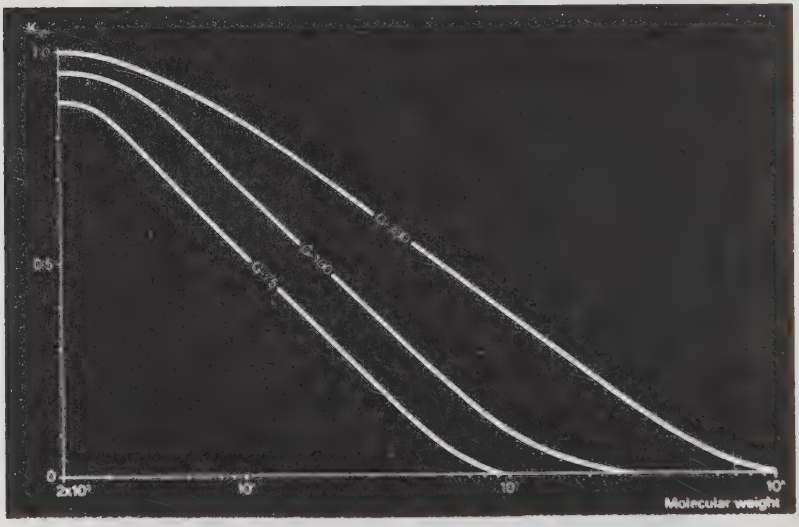
In der Umgebung des Impfstriches bzw. der Stanzlöcher wird die Bildung von Flachrandkolonien induziert.

Abb. 3: Kapazität des Ionenaustauschers DEAE-Sephadex A 50



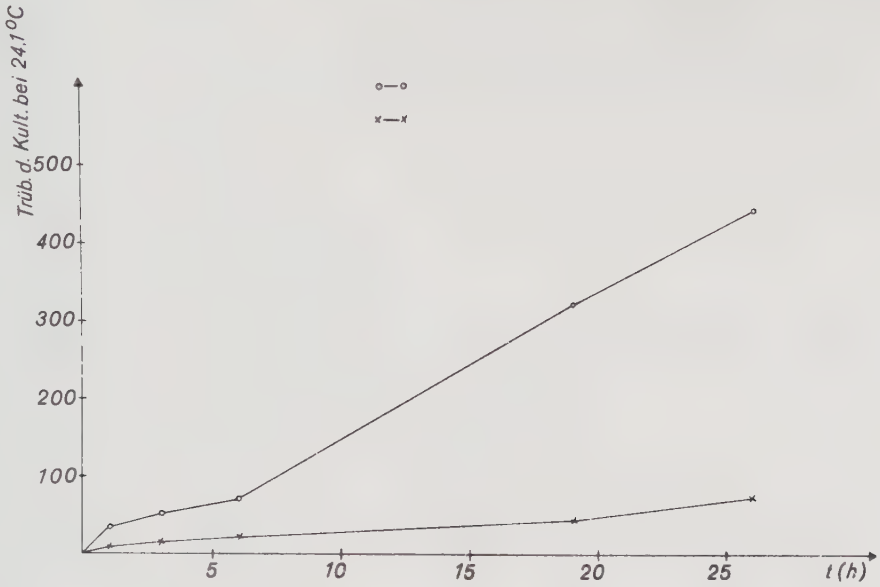
Die Kurve zeigt, daß die Kapazität des Austauschers im sauren und neutralen pH-Bereich am größten ist. Er eignet sich am besten für Trennungen bei pH 5-7.

Abb. 4: Beziehungen zwischen Elutionsvolumen und Molekulargewicht von globulären Proteinen bei Trennung durch Gelfiltration mit Sephadex G 100



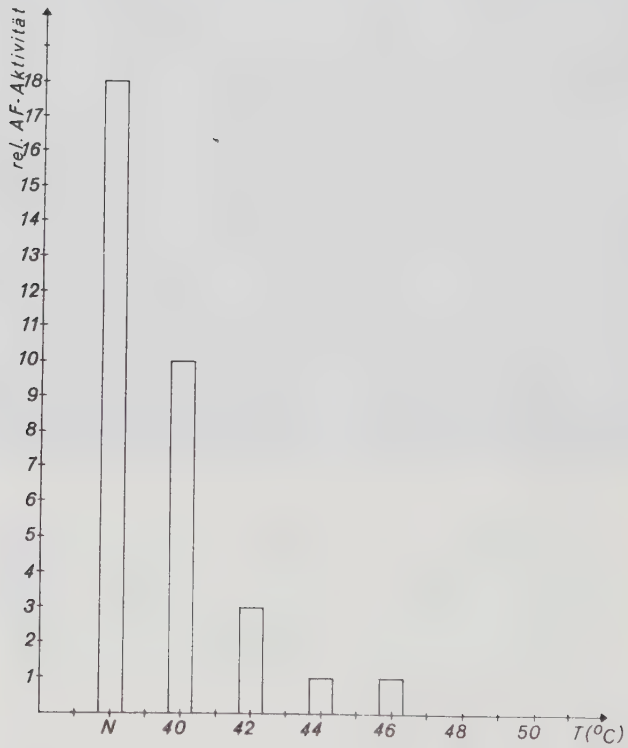
Die Kurve zeigt, daß die Beziehung zwischen dem Elutionsverhalten K_{av} und dem Molekulargewicht im Bereich von MG=10^4 bis $7 \cdot 10^4$ annähernd linear ist.

Abb. 5: Wachstumskurve von Pasteurella pneumotropica A/5a und Acinetobacter haemolyticus 66124/64 unter sauerstofflimitierten Bedingungen



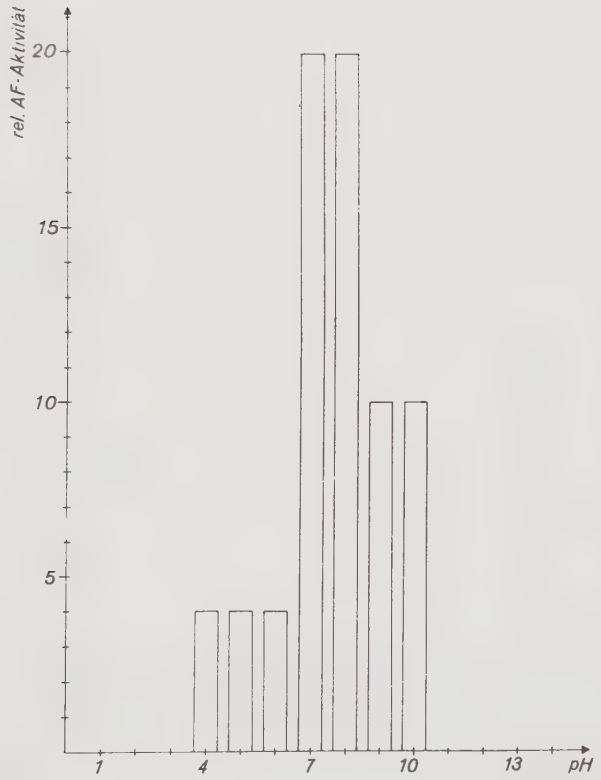
Das Wachstum der beiden Stämme wurde wie unter 3.2.2. beschreiben, ermittelt.(x—x : P. pneumotropica A/5a, o—o : A. haemolyticus 66124/64).

Abb. 6: Temperaturempfindlichkeit des AF im Kulturüberstand



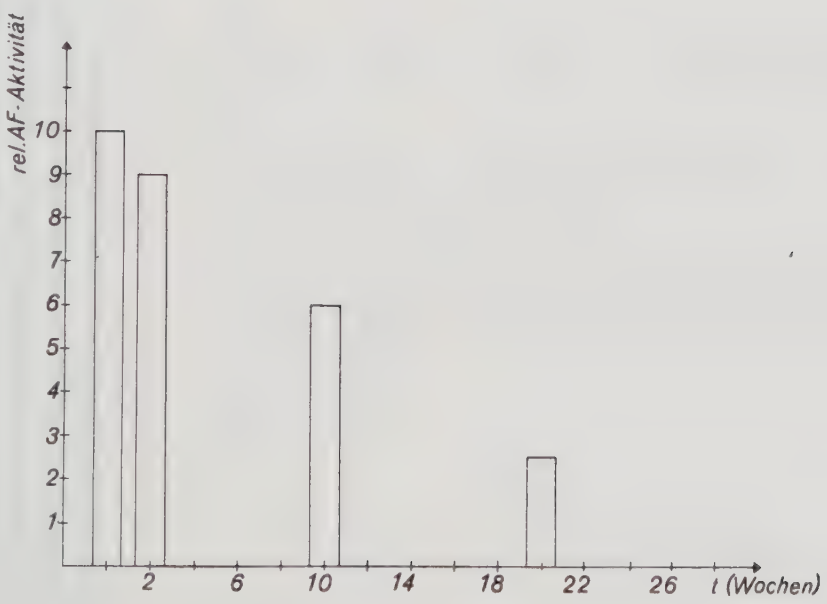
Der Überstand wurde für 45 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. N bezeichnet die Aktivität des unbehandelten Kulturüberstandes. Die Abbildung zeigt, daß die Aktivität im Temperaturbereichen über 40°C zerstört wird.

Abb. 7: pH-Empfindlichkeit des AF im Kulturüberstand



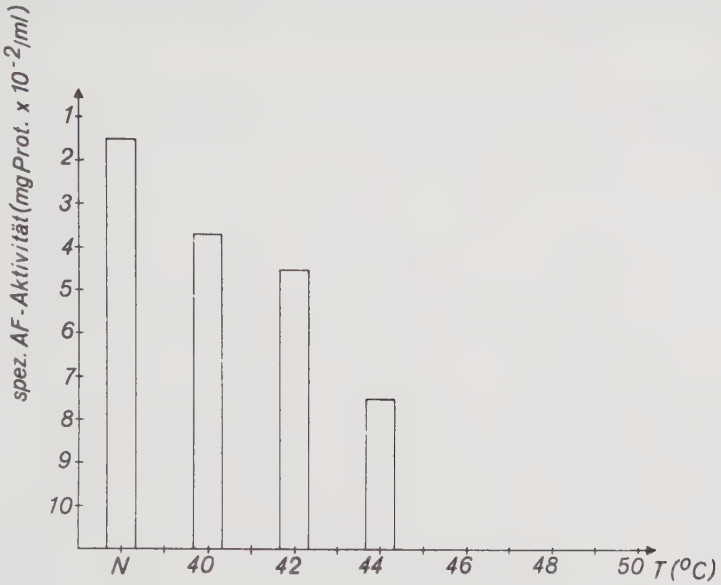
Die Proben wurden mit HCl oder NaOH auf pH 4 bis pH 10 eingestellt und 4 Stunden bei $4^{o}C$ inkubiert und danach wieder auf den Ausgangs-pH zurücktitriert. Der AF erwies sich dabei als relativ stabil gegen Veränderungen des pH.

Abb. 8: Lagerungsstabilität des AF im Kulturüberstand bei $4^{o}C$



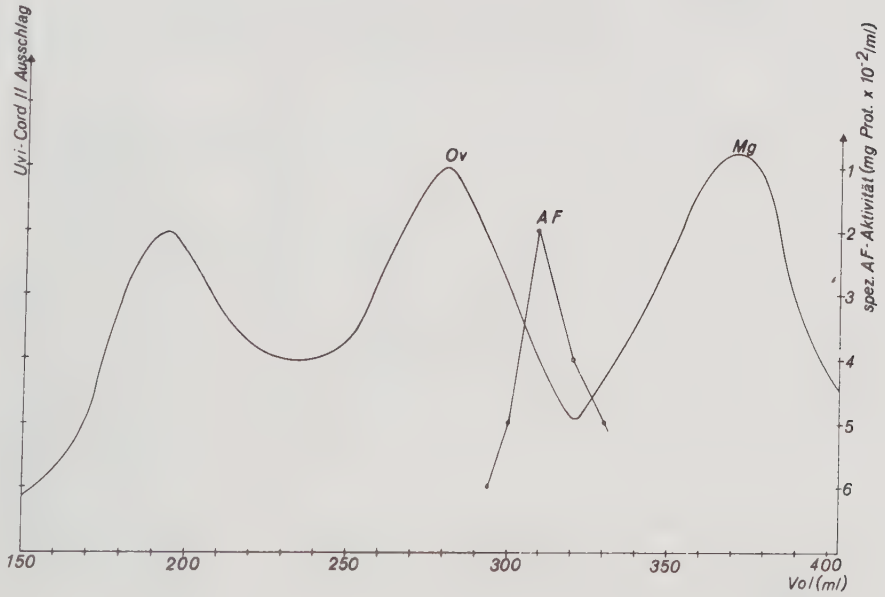
Die Proben wurden steril bei $4^{o}C$ aufbewahrt. Es zeigte sich über Wochen hin ein langsamer Abfall der Aktivität.

Abb. 9: Wärmestabilität des AF im DEAE-Eluat



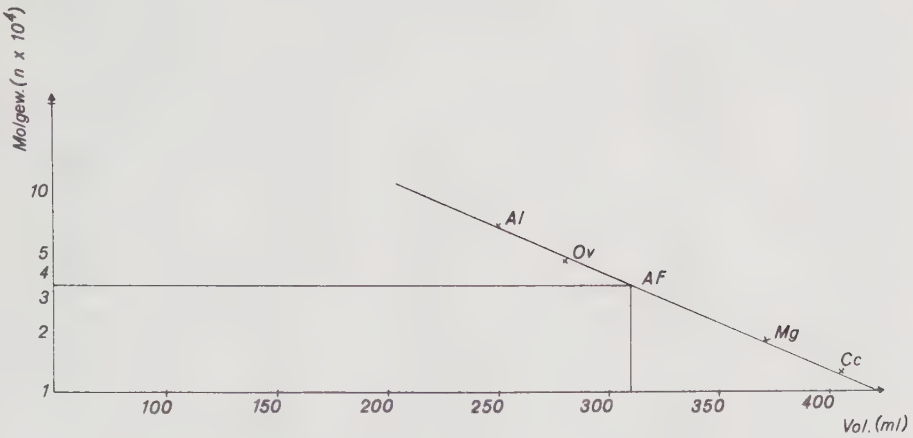
Das Eluat wurde für 45 min bei verschiedenen Temperaturen über 40°C inkubiert. N bezeichnet die spezifische Aktivät des unbehandelten Eluats. Der AF erwies sich auch in dieser Untersuchung als wärmeempfindlich.

Abb. 10: Absorption bei 280 nm und AF-Aktivität des Sephadex G 100-Eluats



Der AF wurde über Sephadex G 100 wie unter 2.5.2. beschrieben, eluiert. Die AF-aktivität lag zwischen Ovalbumin und Myoglobin; das Molekulargewicht liegt demnach zwischen dem von Ovalbumin (MG= 45 000) und dem von Myoglobin (MG= 17 800).

Abb. 11: Molekulargewichtsbestimmung des AF



Das Molekulargewicht wurde nach Elution auf Dephadex G 100 graphisch in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen bestimmt.
Als Marker dienten Rinderalbumin (Al, MG= 67 800), Ovalbumin (Ov, MG= 45 000), Myoglobin (Mg, MG= 17 800) und Cytochrom C (Cc, MG= 12 400).
Das ermittelte Molekulargewicht für den AF beträgt ca. 34 000.

7.0.0. Literatur

ARKWRIGHT, J.A.
Variation in bacteria in relation to agglutination by salts and by specific antisera.
J. Path. 23 (1920) 358-360

ARKWRIGHT, J.A.
Variation of bacteria in relation to agglutination both by salts and specific serum.
J. Path. 24 (1921) 36-60

AVERY, O.T., C.M. McLEOD, M. McCARTY
Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types.
J. Exp. Med. 79 (1944) 137-157

BIBERSTEIN, E.L., M.E. MEYER, P.C. KENNEDY
Colonial variation of Pasteurella haemolytica isolated from sheep.
J. Bacteriol. 76 (1958) 445-452

BREUIL, C., D.J. KUSHNER
Lipase and esterase formation by psychrophilic and mesophilic Acinetobacter species.
Can. J. Microbiol. 21 (1975) 423-433

BÜRGER, H.
Biochemische Leistungen nicht proliferierender Mikroorganismen.
Zbl. Bakt., Hyg., Abt.I Orig. A 202 (1967) 97-109

BÜRGER, H.
Biochemische Leistungen nicht proliferierender Mikroorganismen.
Zbl. Bakt., Hyg., Abt.I Orig. A 202 (1967) 395-401

CARTER, G.R.
Studies on Pasteurella multocida. I. A hemagglutination test for the identification of serological types.
Am. J. Vet. Res. 16 (1955) 481-484

CARTER, G.R.
Studies on Pasteurella multocida. II. Identification of antigenic characteristics and colonial variants.
Am. J. Vet. Res. 18 (1957) 210-213

CARTER, G.R., C.H. BIGLAND
Dissociation and virulence of Pasteurella multocida isolated from a variety of lesions.
Can. J. Comp. Med. & Vet. Sci. 17 (1953) 473-479

DAWSON, M.H.
Dissociation of Pneumococcus. A new colony variant.
Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 30 (1932/33) 806-808

DOMBROVICEANU, A., C. COMBIESCO, E. SORU
Action in vitro du bactériophage sur les propriétés du vibrion cholérique.
C. r. Soc. Biol. Paris 115 (1934) 1320-1322

EDWARDS, P.R., W.H. EWING
Identification of Enterobacteriaceae.
Burgess Publ. Co., 1972, 3rd ed., Minneapolis

ELBERG, S.S., CHENG-LEE HO
Studies of dissociation in Pasteurella multocida.
J. Comp. Path. Therap. 60 (1950) 42-50

HENRICHSEN, J.
Bacterial surface translocation: a survey and a classification.
Bacteriol. Rev. 36 (1972) 478-503

HENRICHSEN, J., L.O. FRØHOLM, K. BØVRE
Studies on the bacterial surface translocation. II. Twitching motility associated with fimbration in colony variants of Moraxella nonliquefaciens and M. kingii.
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect.B 8o (1972) 445-452

HENRIKSEN, S.D., L.O. FRØHOLM
A fimbriated strain of Pasteurella multocida with spreading and corroding colonies.
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect.B 83 (1975) 129-132

HERBST, E.J., E.B. GLINOS, L.H. AMUNDSEN
An analysis of the putrescine requirement of Hemophilus parainfluenzae.
J. Bacteriol. 214 (1955) 175-184

KAUFFMANN, F.
The bacteriology of Enterobacteriaceae.
The William & Wilkins Co., 1966, Baltimore

KRÖGER, E.
Die Variation S/R und O/o insbesondere bei gramnegativen Darmbakterien.
Ergebn. Hyg. Bakt. Immun. Exp. Ther. 29 (1955) 475-622

LAUTROP, H.
Genus IV. Acinetobacter.
In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., R.E. Buchanan & N.E. Gibbons (eds.) 1974, p.436-438

MANNHEIM, W.
Serologische Untersuchungen an unbeweglichen hämolysierenden Achromobacter-Stämmen aus Conjunctiva und Respirationstrakt.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. A. 186 (1962) 528-543

MANNHEIM, W., W. STENZEL
Zur Systematik der obligat aeroben gramnegativen Diplobakterien des Menschen.
Zbl. Bakt. Hyg.I. Orig. A 186 (1962(55-83

MANNHEIM, W., W. STENZEL
On the classification and nomenclature of some nonmotile and coccoid diplobacteria exhibiting the properties of Achromobacteriaceae.
Int. J. System. Bacteriol. 13 (1963(195-200

MANNHEIM, W., G. WOLF
The temperature requirements of growth of some mycoplasmas.
Zbl. Bakt. Hyg. I Orig. A. 221 (1972) 234-249

MORRIS, C.J.O.R., P. MORRIS
Separation methods in biochemistry.
Pitman Publ. Co., 1976, 2nd ed., London

v. PRITTWITZ, P., J. GAFFRON
Untersuchung über die Struktur von S- und R-Formen bei gramnegativen Darmbakterien mit dem Phasenkontrastmikroskop.
Arch Hyg. 136 (1952) 218-225

RAFI SHAIKH, M., I. LOMINSKI
Outbursting wedges of the colonies of Clostridium welchii containing chain forming mutants after ultra-violet irradiation.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. A 230 (1975) 246-251

RAFI SHAIKH, M., I. LOMINSKI
Feathery outbursts of colonies of Clostridium sporogenes containing chain forming mutants after ultra-violet irradiation.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. A 231 (1975) 485-490

SMITH, J.E.
Genus Pasteurella.
In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., R.E. Buchanan & N.E. Gibbons (eds.) 1974, p, 370-373, The Williams & Wilkins Co., Baltimore

SZARKOWSKA, L., M. KLINGENBERG
On the role of ubiquinone in mitochondria: Spectrophotometric and chemical measurement of its redox reactions.
Biochem. Z. 338 (1963) 674-697

TACU, D., A.TACU
Cercetări morphologice, biochimice, de patogenitate si imunologice a unor tulpini de Pasteurella multocida in colonii inelare.
Luc. Inst. Cercetari Vet. Bioprep. Pasteur 6 (1967) 439-444

WESSMAN, G.E.
Interrelationships of smooth and nonsmooth variants in the dissociation of Pasteurella haemolytica.
J. Bacteriol. 88 (1964) 356-360

WESTPHAL, O., O. LÜDERITZ
3,6-Didesoxyhexosen -Chemie und Biologie.
Angew. Chem. 72 (1960) 881-891

WHITE, P.B.
Notes on intestinal bacilli with special reference to smooth and rough races.
J. Path. 32 (1929) 85-91

Die vorliegende Arbeit entstand im Hygiene-Institut und Medizinaluntersuchungsamt der Philipps-Universität Marburg/Lahn.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W.Mannheim für die Themenstellung und für die ständige Betreuung und Förderung der Arbeit.
Ebenso danken möchte ich Herrn Dr. R.Holländer und Herrn Dipl.-Biol. E.U. Walter für die Unterstützung bei einigen Experimenten und die anregenden Diskussionen.
Ebenfalls möchte ich allen weiteren Mitarbeitern des Hygiene-Instituts für ihre ständige Hilfsbereitschaft danken.

Lebenslauf

7.5.1953	in Neuhof als Sohn des Tierarztes Dr. Adolf Jahn und seiner Ehefrau Waltraud geb. Schneider geboren
1959-1963	Besuch der Volksschule Neuhof
1963-1971	Besuch des Freiherr-vom-Stein Gymnasiums Fulda
Juni 1971	Reifeprüfung
SS 1972	Studium der Haushalts- und Ernährungswissenschaften an der Universität Giessen
WS 1972- SS 1974	Studium der Medizin an der Universität Nancy (Frankreich)
WS 1974- SS 1975	Studium der Medizin an der Goethe-Universität Frankfurt
WS 1975	Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg
SS 1976	Studium der Medizin an der Universität Nottingham (England)
WS 1976- SS 1978	Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg
Okt. 1978	Staatsexamen

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren

Arnoulh, Bode, Borelli, Callot, Dombrowski, Duheil, Eißner, Exner, Friedrich, Fitzsimons, Gerdes, Horst, Hardewig, Hamelmann, Heene, Jones, Koranski, Kleinsasser, Legnet, Martini, Murphy, Mannheim, Pohlen, Palm, Rodeck, Rotter